

## 不活性化センダイウイルス (HVJ-E) の高分子による機能化とバイオマテリアルへの応用

著者	岡田 孝春
発行年	2016
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2015
報告番号	12102甲第7677号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00143333">http://hdl.handle.net/2241/00143333</a>

氏 名	岡田 孝春
学 位 の 種 類	博 士 ( 工 学 )
学 位 記 番 号	博 甲 第 7677 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審 査 研 究 科	数理物質科学研究科
学 位 論 文 題 目	不活性化センダイウイルス (HVJ-E) の高分子による機能化とバイオマテリアルへの応用

主	査	筑波大学教授	博士(工学)	竹内正之
副	査	筑波大学教授	工学博士	三木一司
副	査	筑波大学准教授	博士(工学)	内藤昌信
副	査	筑波大学准教授	博士(農学)	辻村清也
副	査	日本大学教授	博士(工学)	青柳隆夫

## 論 文 の 要 旨

ウイルス感染メカニズム研究の進展や感染予防法が整備されるに伴い、ウイルスの病原性や増殖能を不活性化し、運搬ツールとして利用する、あるいは修飾を施すことにより新たな機能を付与する研究がなされるようになった。センダイウイルスを UV 照射により不活化させた不活性化センダイウイルス(HVJ-E)は、人には無害であり、細胞への融合能の維持、抗腫瘍免疫の誘導等の特徴が報告されており、遺伝子デリバリーやドラッグデリバリーを指向した基礎研究が行われてきた。しかしながら、その高い細胞認識能・融合能がそのマテリアルとしての適用範囲を狭めていた。HVJ-E の特徴を活かしつつ新規なバイオマテリアルとして利用するためには、異種材料との複合化が必要となると考えられるが、HVJ-E のような脂質二分子膜を有するウイルスエンベロープ膜上に安定に複合化を行い機能化する報告はなされていなかった。

これらの背景のもと、本論文では、ウイルスとして HVJ-E を用い、Layer-by-Layer (LbL) 法を用いた表面修飾による機能化ならびに LbL 界面との複合化による機能化を新たに提案し、新規バイオマテリアルとしての HVJ-E 複合マテリアルの評価を中心課題として研究を行った。

第2章では、HVJ-E を利用した高効率・低侵襲な治療法開発を目指し、HVJ-E の特徴となる抗腫瘍効果を維持したまま細胞認識能を阻害する HVJ-E 表面修飾法を新たに検討した。溶液中における HVJ-E の表面電荷を明らかとし、静電相互作用を利用する LbL 法が適用可能な pH、利用可能な生体適合性高分子を絞り込み、カチオン性高分子を足場とするヒアルロン酸被覆による HVJ-E 粒子表面修飾法を確立した。ヒアルロン酸は生体適合性に加え、腫瘍細胞上に過剰発現する CD44 レセプターと高い親和性を

有することが知られており、腫瘍部位への能動的標的能の付与が期待されるためである。LbL 膜で被覆された HVJ-E は、その LbL 層の増大に従い赤血球の溶血活性が減少することを確認した。本成果は HVJ-E のウイルスエンベロープ膜上に安定に複合化を行った初めての例であるだけでなく、生体内における効率的な HVJ-E の抗腫瘍免疫発現へと繋がると期待される。

第3章では、Poly- $\epsilon$ -Caprolactone (PCL) を電界紡糸法によりナノファイバー状に成型したファイバー表面に HVJ-E を固定化し、生体内で所定時間徐放可能な HVJ-E 吸着ナノファイバーの開発を行った。PCL ナノファイバー表面上に LbL 法によりカチオン性高分子である Poly-L-Lysine (PLL) とアニオン性高分子であるアルギン酸を用いた高分子層を形成し、HVJ-E 吸着の足場とした。カチオン性高分子である PLL の最表面に対し、アニオン性電荷を有する HVJ-E を吸着させることで、HVJ-E を表面に集積した HVJ-E ナノファイバーを得ることに成功した。HVJ-E がナノファイバー上に固定化された後も活性を有し、癌細胞の成長を 72 時間抑制しただけでなく、細胞数を減少させることが確認された。この結果から HVJ-E 徐放ファイバーの有用性が明らかとなった。

第4章では、HVJ-E が細胞表面のシアル酸の一種である GD1a を認識し、細胞に選択的に吸着することを利用した細胞分離方法の開発を行った。LbL 法によりガラス基板上に作製された PLL とアルギン酸の交互積層膜を作製し、HVJ-E を表面に固定したところ、単層で最密充填していることが明らかとなった。さらに、表面に固定化した HVJ-E が GD1a 発現細胞を優位に捕捉することを見出した。以上の結果をもとに、ガラス基板上に作製された HVJ-E 固定薄膜を利用することで、2 種類の細胞混合液から、1 種類の細胞を選別することに成功した。

## 審 査 の 要 旨

〔批評〕

ウイルスを機能性巨大分子として利用するためには、ウイルスが内在的に有する必要な特徴は損なわずに異種材料と複合化することで機能化し、新規バイオマテリアルを創出する戦略が求められている。そのためには、安全なウイルスであること、複合化させる手法の選択、ならびに、異種材料とウイルスとの界面における相互作用の理解と制御が重要となる。本論文においては、単独で癌細胞に細胞死を誘導する能力を有する HVJ-E を選択し、表面電荷を利用することが可能な LbL 法を用いたバイオマテリアル化を報告している。HVJ-E そのものへのナノ交互積層膜作製条件を丁寧に検討し、エンベロープを有する HVJ-E にも LbL 法が有効であることを新たに見いだした。この結果をうけ、新たに HVJ-E のナノファイバー上への固定化、ガラス基板上への緻密集積に成功しており、それぞれその徐放性、HVJ-E の細胞識別能を利用した、徐放ファイバーメッシュ、新規細胞分離システムの構築に成功した。これらの結果は、抗腫瘍免疫を誘導することが可能な HVJ-E の適用範囲を広げるだけでなく、高分子を用いたウイルスの機能化において、その界面における相互作用の理解が重要であることを明示したものである。さらには、機能性巨大分子としてウイルスを利用する研究に大きく貢献するもので、高く評価できる。

〔最終試験結果〕

平成 28 年 2 月 15 日、数理物質科学研究科学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。